

## اثرات فاسیولا هیپاتیکا در مدل کولیت اولسراتیو ناشی از اسید استیک در رت

بیژن اسمعیل نژاد<sup>۱\*</sup>، سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۲</sup>، علی اصغر طهرانی<sup>۱</sup>، هادی اسمعیلی گورچین قلعه<sup>۳</sup>، فرشید مشرف زاده<sup>۱</sup>

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** کولیت اولسراتیو از علل شایع بیماری‌های دستگاه گوارش در کشورهای توسعه‌یافته است. این بیماری باعث ازکارافتادگی به‌خصوص در بالغین جوان می‌شود و بار اقتصادی و اجتماعی زیادی را به جامعه تحمیل می‌کند. کنترل التهاب و کاستن از اثرات سوء داروها از اهداف مهم درمان کولیت اولسراتیو است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات فاسیولا هیپاتیکا در مدل کولیت اولسراتیو ناشی از اسید استیک در رت است.

**مواد و روش‌ها:** بعد از القای کولیت، رت‌ها در سه گروه ده‌تایی (گروه بدون تیمار، گروه تیمار شده با پردنیزولون  $0.5\text{mg/Kg}$  زیر جلدی) و درمان شده با انگل فاسیولا هیپاتیکا ( $100\text{ mg/Kg}$  زیر جلدی) تقسیم شدند. پس از ۱۰ روز رت‌ها آسان‌کشی شده و از نظر ضایعات ماکروسکوپی و تولید واسطه‌های التهابی در بافت روده و میزان تولید سایتوکاین‌های  $\text{TNF-}\alpha$  و  $\text{IL-6}$  مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که کاهش میزان تولید میلوپراکسیداز بافتی در گروه درمانی فاسیولا هیپاتیکا در مقایسه با پردنیزولون تفاوت آماری معناداری ندارد. میزان تولید سایتوکاین‌های  $\text{TNF-}\alpha$  و  $\text{IL-6}$  در گروه‌های درمانی فاسیولا هیپاتیکا و پردنیزولون نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری یافته بود. البته میزان کاهش در گروه درمان شده با پردنیزولون از نظر آماری بیشتر بود. بالعکس کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه درمان شده نسبت به گروه پردنیزولون بیشتر بود. باین حال شدت کاهش علائم گراس و همچنین شاخص بقای رت‌ها در هر دو گروه درمان شده با پردنیزولون و درمان شده با فاسیولا هیپاتیکا یکسان بود.

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که دست‌یابی به فاسیولا هیپاتیکا ساده و سریع است، ممکن است از آن به‌عنوان یک روش درمانی جهت تخفیف علائم کولیت اولسراتیو استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** کولیت اولسراتیو، اسید استیک، رت، فاسیولا هیپاتیکا، التهاب

### مقدمه

آنزیمی بنام سیستین پروتئاز است که مانع از فعالیت گیرنده‌های شبه تول<sup>۱</sup> (TLR) می‌شود (۳). مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که گیرنده‌های TLR یکی از عوامل دخیل در ایجاد بیماری کولیت اولسراتیو می‌باشند (۴، ۵). مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که فاسیولا هیپاتیکا موجب بهبود علائم بیماری‌های خود ایمن شده و افزایش چشمگیر درصد سلول‌های T تنظیمی را

فاسیولوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده که هم به لحاظ اقتصادی و هم به لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت است. این بیماری توسط ترماتودهای کبدی گونه‌های فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژینگاتییکا ایجاد می‌شود. به لحاظ اهمیت بیماری‌زایی، گونه فاسیولا هیپاتیکا مهم‌ترین ترماتود گوسفندان، بزها و گاوهاست (۱، ۲). گونه فاسیولا هیپاتیکا دارای

<sup>1</sup>Toll Like Receptor

\*نویسنده مسئول: بیژن اسمعیل نژاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
E-mail: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir  
https://orcid.org/0000-0003-1781-5890

موجب می‌گردد (۶، ۷). همچنین محققان نشان داده‌اند که فاسیولا هیپاتیکا باعث القای پاسخ‌های Th2 و سرکوب Th1 می‌شود. آنتی‌ژن‌های Fg و GE فاسیولا هیپاتیکا موجب کاهش معنادار میزان TNF- $\alpha$  و اینترفرون گاما و افزایش مقادیر IL-10 و IL-4 می‌شود (۸). فلوک‌های کبدی فاسیولا هیپاتیکا موجب جهت‌دهی قوی پاسخ‌های سیستم ایمنی به سمت Th2 شده و تغییر کلاس تولید آنتی‌بادی می‌شود نه تنها پاسخ‌های Th1 را مهار می‌کند بلکه مطالعات انجام‌شده بر روی بیماری مالتیپل اسکلروزیس نشان داده است که فاسیولا هیپاتیکا با مهار پاسخ‌های Th1 و Th17 موجب بهبود علائم بیماری می‌شود (۹). پاسخ‌های Th2 در عفونت‌های مزمن فاسیولا هیپاتیکا نیز ایجاد می‌شوند. مطالعات ثابت کرده‌اند که محصولات ترش‌حی و تولیدی فاسیولا هیپاتیکا موجب القای پاسخ‌های Th2 می‌شود (۱۰). علاوه بر این فاسیولا هیپاتیکا پاسخ Th1 القاشده به دنبال عفونت بردتلا پرتوسیسی و مایکوباکتریوم بویس را سرکوب کرده و موجب کاهش تعداد ماست سل‌های فعال‌شده توسط Th1 در موش می‌شود (۱۱).

بیماری التهابی روده به‌عنوان یکی از بیماری‌های جوامع صنعتی معرفی شده است که درصد زیادی از جامعه جوان کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تأثیر مستقیمی بر روی کیفیت زندگی بیماران دارد. کشور ایران نیز به‌عنوان یکی از جوامع در حال رشد و توسعه در منطقه خاورمیانه از این قانون مستثنا نیست. پیشرفت‌های صنعتی، مصرف سوخت‌های فسیلی و تغییر در شیوه زندگی مردم از جمله مهم‌ترین عواملی است که جامعه ایران را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). مطابق مطالعات اپیدمیولوژیک انجام‌گرفته در ایران درصد بروز بیماری‌های التهابی در چند سال اخیر افزایش یافته است به‌گونه‌ای که علائم بیماری در تعداد زیادی از افراد جامعه در سنین ۱۱ تا ۳۱ سال مشاهده می‌گردد (۱۳، ۱۴). تا به امروز پژوهشگران نتوانسته‌اند اتیولوژی دقیق بیماری را شناسایی کنند. به همین دلیل بیماری بیشتر به‌عنوان یک بیماری چند فاکتوری در محافل علمی و مقالات معرفی می‌شود. به دلیل عدم شناسایی اتیولوژی دقیق لذا درمان قطعی نیز برای بیماری موجود نیست. به همین دلیل درصد زیادی از بیماران مبتلا به بیماری‌های التهابی روده‌ای، به درمان‌های موجود به‌خوبی پاسخ نمی‌دهند و علائم بیماری به‌صورت دوره‌ای عود می‌کند (۱۵). اگرچه دلیل قطعی و اصلی بیماری مشخص نیست، با این‌وجود دانشمندان

پاسخ‌های سیستم ایمنی، استعداد ژنتیکی و اثرات محیطی را سه ضلع اصلی بروز این بیماری می‌دانند. درمان‌های دارویی و تغذیه‌ای که امروزه به‌منظور سرکوب بیماری به کار می‌رود اکثراً درمان‌های علامتی و حمایتی می‌باشند بدان معنا که نمی‌توانند بیماری را به‌طور کامل درمان کنند. از سوی دیگر بخش اعظمی از داروهای موجود به دلیل عدم تأثیرگذاری، سمیت بالا، تداخل دارویی و اثرات جانبی دارای محدودیت مصرف می‌باشند (۱۶). به همین دلیل وجود یک گزینه درمانی جدید با کمترین اثرات جانبی و بیشترین اثرات ضدالتهابی بیش‌ازپیش احساس می‌شود. کنترل التهاب و کاستن از اثرات سوء داروها از اهداف مهم درمان کولیت اولسراتیو است. استفاده از داروهای ضدالتهاب کورتیکواستروئیدی و آمینوسالسیلات‌ها مؤثرترین روش درمان کولیت اولسراتیو است (۱۷). اکثر این داروها دارای اثرات جانبی شدید از جمله ایجاد اسهال، استفراغ، اختلالات کبدی، اختلالات کلیوی، پانکراتیت و زخم‌های دستگاه گوارش می‌باشند. به‌علاوه همه بیماران به درمان پاسخ مناسبی نمی‌دهند (۱۸). از طرف دیگر بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو در صورت عدم کنترل التهاب در خطر ایجاد سرطان روده بزرگ هستند (۱۹). به همین دلیل تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن داروهای مؤثر با اثرات جانبی کمتر انجام می‌گیرد. تاکنون تأثیر داروها و مواد شیمیایی مختلفی بر روی بافت‌های التهابی روده در کولیت القایی سنجیده شده است. با این‌حال تاکنون مطالعه‌ای بر روی ارتباط مستقیم در رابطه با استفاده از آنتی‌ژن‌های انگلی در تخفیف شدت بروز بیماری کولیت اولسراتیو گزارش نشده است. لذا تحقیق پیش رو بر اساس درمان تجربی کولیت با کرم فاسیولا هیپاتیکا بنیاد شده است.

### مواد و روش‌ها

**طراحی آزمایش:** جامعه مورد مطالعه، شامل رت‌های نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بود که از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد. رت‌ها در قفسه‌های مجزا در شرایط کنترل‌شده (دمای استاندارد، رطوبت و چرخه روز و شب) و با رژیم غذایی طبیعی و آب نگهداری شدند. قبل از القای بیماری رت‌ها به مدت ۳۶ ساعت در حالت عدم دسترسی به غذا ولی با دسترسی به آب نگهداری شدند. تحت یک بیهوشی خفیف با اتر به‌منظور القای اولسر، میزان ۲ میلی‌لیتر اسید استیک ۴ درصد از طریق یک لوله پلی‌اتیلنی به داخل رکتوم

بیماری التهابی روده به‌عنوان یکی از بیماری‌های جوامع صنعتی معرفی شده است که درصد زیادی از جامعه جوان کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تأثیر مستقیمی بر روی کیفیت زندگی بیماران دارد. کشور ایران نیز به‌عنوان یکی از جوامع در حال رشد و توسعه در منطقه خاورمیانه از این قانون مستثنا نیست. پیشرفت‌های صنعتی، مصرف سوخت‌های فسیلی و تغییر در شیوه زندگی مردم از جمله مهم‌ترین عواملی است که جامعه ایران را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). مطابق مطالعات اپیدمیولوژیک انجام‌گرفته در ایران درصد بروز بیماری‌های التهابی در چند سال اخیر افزایش یافته است به‌گونه‌ای که علائم بیماری در تعداد زیادی از افراد جامعه در سنین ۱۱ تا ۳۱ سال مشاهده می‌گردد (۱۳، ۱۴). تا به امروز پژوهشگران نتوانسته‌اند اتیولوژی دقیق بیماری را شناسایی کنند. به همین دلیل بیماری بیشتر به‌عنوان یک بیماری چند فاکتوری در محافل علمی و مقالات معرفی می‌شود. به دلیل عدم شناسایی اتیولوژی دقیق لذا درمان قطعی نیز برای بیماری موجود نیست. به همین دلیل درصد زیادی از بیماران مبتلا به بیماری‌های التهابی روده‌ای، به درمان‌های موجود به‌خوبی پاسخ نمی‌دهند و علائم بیماری به‌صورت دوره‌ای عود می‌کند (۱۵). اگرچه دلیل قطعی و اصلی بیماری مشخص نیست، با این‌وجود دانشمندان



**بررسی شاخص شدت بیماری:** در انتهای بیماری رت‌ها از نظر وضعیت نظر قوام مدفوع و وجود خون در آن ارزیابی شدند و مطابق جدول ۱ برای هر مورد نمره بندی شدند. در انتها مجموع دو نمره مرتبط با قوام مدفوع و وجود خون در آن به عنوان تعیین شاخص شدت بیماری (DAI) در هر رت استفاده شد.

جدول ۱- نمره بندی به وضعیت مدفوع و مخاط

| رتبه | قوام مدفوع | خون در مدفوع |
|------|------------|--------------|
| ۰    | نرمال      | نرمال        |
| ۱    | نرم        | قرمز         |
| ۲    | خیلی نرم   | قرمز سیاه    |
| ۳    | اسهال      | سیاه         |

**سنجش میلوپراکسیداز:** در این روش مقدار آنزیم میلوپروکسیداز موجود در سوپرناتانت حاصل از هموژنیزاسیون بافت رکتوم با  $5,5,3,3$  تترا متیل بنزیدین واکنش می‌دهد. طی این  $5,5,3,3$  تترا متیل بنزیدین به عنوان دهنده یون هیدروژن برای احیا  $H_2O_2$  توسط میلوپروکسیداز عمل می‌کند. در نتیجه  $5,5,3,3$  تترا متیل بنزیدین به  $5,5,3,3$  تترا متیل بنزیدین دیمین تبدیل شده که باعث بروز یک رنگ آبی تا سبز می‌گردد. با افزودن اسیدسولفوریک واکنش متوقف می‌شود و رنگ محلول به زرد تا زرد کمرنگ تبدیل می‌گردد. نمونه‌ها در طول موج  $450$  نانومتر توسط الیزا ریدر خوانده شدند ( $20$ ).

**سنجش میزان لپید پراکسیداسیون:** اساس واکنش بر پایه تولید یک ترکیب رنگی میان مالون دی‌آلدهید (MDA) با تیو باربیتوریک اسید (TBA) است. به طور خلاصه  $50$  میکرولیتر از نمونه سوپرناتانت حاصل از هموژنیزاسیون بافت رکتوم با  $300$  میکرولیتر اسید اورتو فسفریک در لوله‌آزمایش مخلوط و به مدت یک دقیقه کاملاً ورتکس شد. آنگاه  $100$  میکرولیتر اسید تیورباربیتوریک به مخلوط قبلی اضافه و به مدت  $45$  دقیقه در

تزیق شد. رت‌های خریداری شده در ۴ گروه که هر گروه شامل ۱۰ رت بود به صورت تصادفی و به ترتیب زیر قرار گرفتند. گروه اول به عنوان گروه کنترل که شامل ۱۰ رت سالم بود که تحت هیچ بیماری قرار نگرفتند. گروه دوم شامل ۱۰ رت بود که به عنوان گروه شاهد منفی که در آن‌ها بیماری کولیت اولسراتیو الفاشده و تحت هیچ درمانی قرار نگرفتند. گروه سوم، شامل ۱۰ رت بود که بعد از القای بیماری کولیت اولسراتیو تحت درمان با فاسیولا هیپاتیکا با غلظت  $100 \text{ mg/kg}$  به صورت تزیق زیر جلدی قرار گرفتند ( $6, 7$ ). گروه چهارم شامل ۱۰ رت بود که به عنوان گروه شاهد مثبت بعد از القای بیماری تحت درمان با پردنیزولون ( $5 \text{ mg/Kg}$  - زیر جلدی) قرار گرفتند. کلیه درمان‌ها بعد از تلقیح اسید استیک به داخل رکتوم رت‌ها، شروع شده و به مدت ۱۰ روز ادامه یافت.

**تهیه عصاره انگل فاسیولا هیپاتیکا:** فلوک‌های بالغ و زنده فاسیولا هیپاتیکا، توسط متخصص از کبد گاوهای کشته شده در کشتارگاه شهر ارومیه جداسازی شد و سپس به کمک بافر سالین هنکس و  $\text{pH}: 7.4$  شسته شدند. جهت تهیه از نمونه‌های نگه‌داری شده در PBS در شرایط فریزر  $-20$  درجه استفاده شد. نمونه‌ها پس از آب شدن در دمای محیط توسط اسکالپل خرد و له شدند. سپس توسط هموژنایزر، هموژنیزه شدند. از آنجایی که با له کردن انگل پروتئازهای سلولی آزاد شده و می‌توانند در اثر فعالیت آنزیمی خود باعث تخریب گسترده پروتئین‌های انگل شوند، از ماده‌ی PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلورید) در حلال ویژه ایزوپروپانول که خاصیت ضد پروتئاز دارد استفاده شد. جهت سونیکه کردن نمونه‌های له شده از دستگاه سونیکاتور استفاده شد. مقدار  $1$  میلی مولار PMSF در ایزوپروپانول در ۲ مرحله یک مرتبه قبل از عمل سونیکاسیون و بار دیگر پس از سونیکه کردن به نمونه‌ها اضافه شد. تیوپ‌های سونیکاسیون داخل بشرهای پر از یخ خرد شده قرار گرفتند تا در حین سونیکاسیون گرمای حاصله آسیبی به پروتئین‌ها وارد نکند. در مجموع ۳ نوبت  $10$  دقیقه‌ای عمل سونیکاسیون برای نمونه‌ها انجام گرفت و در آخر نمونه‌ها به مدت  $15$  دقیقه در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد با  $10000$  دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند و مایع رویی جدا و در دمای  $-20$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس غلظت  $100$  میلی‌گرم بر کیلوگرم از فاسیولا هیپاتیکا تهیه و از طریق زیر جلدی به حیوانات مورد نظر تزیق گردید.

واریانس یک طرفه و تست توکی استفاده شد. در تمام بررسی‌ها مقدار ( $p < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. داده‌ها به‌صورت  $Mean \pm SD$  گزارش گردید.

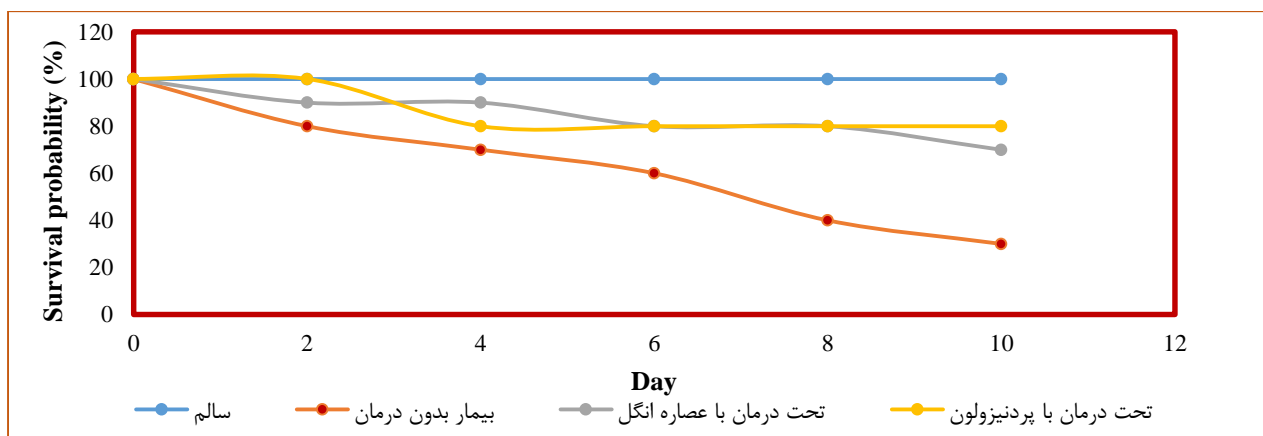
### نتایج

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، تحلیل میزان بقای رت‌ها مبتنی بر تحلیل کاپلان مایر نشان داد که رت‌های مبتلابه کولیت که تحت درمان با پردنیزولون قرار گرفتند منحنی بقای بهتری نسبت به سه گروه دیگر دارند. مطابق نمودار سه روز بعد از درمان، رت‌ها به وضعیت نسبتاً پایداری رسیدند که بیانگر آن است که میزان بقا در این گروه درمانی ۸۰٪ است. بعد از این گروه، گروه درمان شده با انگل نیز با ۷۰٪ میزان بقا نسبتاً قابل قبولی را نشان می‌دهد. البته از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین دو گروه درمانی وجود نداشت ( $p=0.07$ ). گروه کنترل نیز از همان روز اول دوره درمانی به‌طور متوسط در هر روز حداقل یک مورد تلفات داشته است و میزان بقای آن حدود ۲۰٪ است (نمودار ۱).

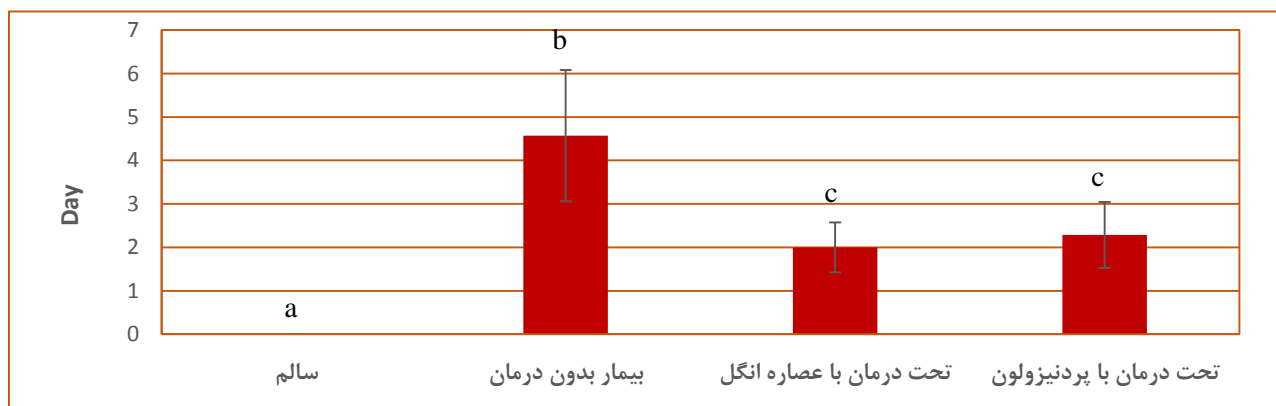
بن ماری در حال جوش قرار داده شد. در ادامه لوله‌آزمایش توسط یخ خنک شد. سپس چهار صد میکرولیتر به هر لوله‌آزمایش (هر نمونه)، N-بوتانل اضافه و به مدت دو دقیقه ورتکس شد. در نهایت لوله‌های آزمایش با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی جدا و با طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب نوری خوانده شد.

**سنجش میزان سرمی سایتوکاین‌های  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$ :** در روش الایزا برای سنجش میزان  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  موجود در سرم رت‌های مورد مطالعه از کیت‌های مربوطه ساخت شرکت Bender med systems استرالیا طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

**روش تحلیل داده‌ها:** جهت تجزیه و تحلیل داده‌های غیر پارامتری مرتبط با شدت بیماری از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. جهت مقایسه سایر داده، بعد از تأیید نرمال بودن توزیع آن‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنف از آزمون آنالیز



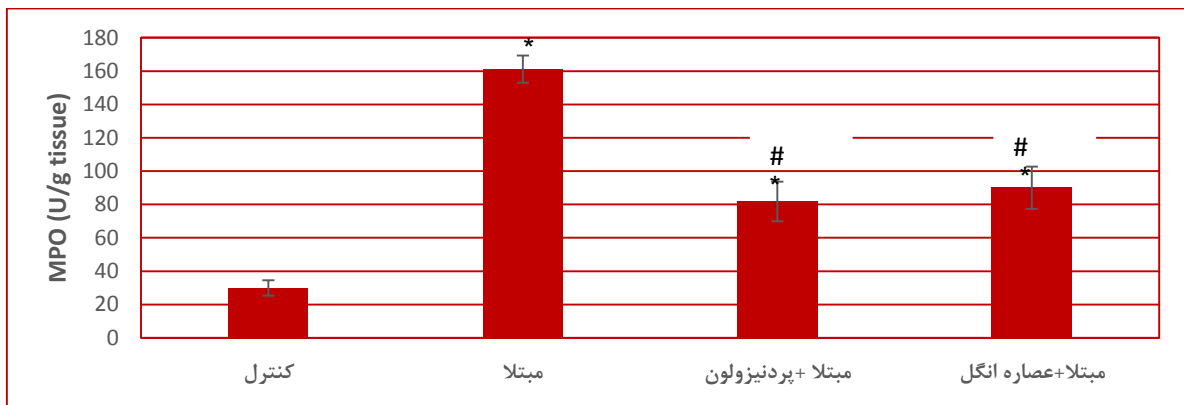
نمودار ۱- مقایسه میزان بقا در گروه‌های درمانی



نمودار ۲- مقایسه شاخص شدت بیماری. حروف کوچک غیرمشابه به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است و حروف مشابه به معنای عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.

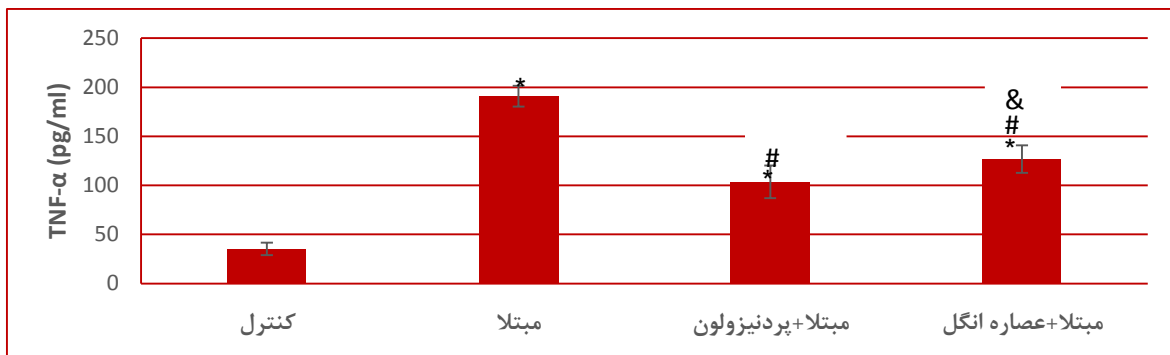
درمان شده با فاسیولا هیپاتیکا و پردنیزولون نسبت به گروه بیمار بدون درمان کاهش معناداری داشته است اما بین دو گروه تفاوت آماری معناداری وجود نداشت ( $p=0.15$ ). البته بررسی‌های آماری نشان داد که تفاوت معناداری میان گروه‌های درمانی با گروه نرمال (سالم) از نظر میزان تولید MPO وجود دارد (نمودار ۳). فعالیت سایتوکاین‌های  $TNF-\alpha$  و IL-6 در گروه‌های مختلف مطالعه بررسی گردید (نمودار ۴). میزان تولید سایتوکاین‌های

مشابه با نتایج میزان بقاء، ارزیابی شاخص شدت بیماری نشان داد که این شاخص در هر دو گروه رت‌های مبتلا به کولیت و درمان شده با پردنیزولون نسبت به گروه مبتلا و بدون درمان کاهش می‌یابد. در اینجا نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین دو گروه درمانی وجود نداشت ( $p=0.11$ ، نمودار ۲). نتایج مربوط به سنجش میلوپراکسیداز (نمودار ۳) نشان داد که مقادیر میلوپراکسیداز تولیدشده در بافت رکتوم رت‌های

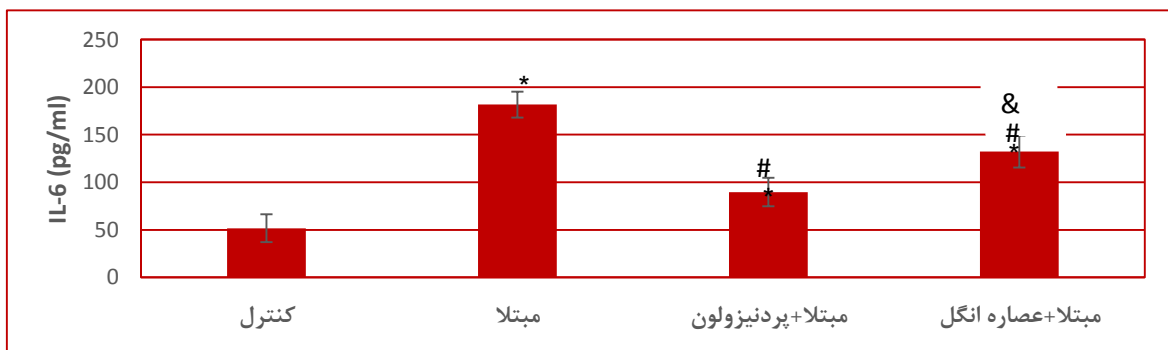


نمودار ۳- مقایسه میزان فعالیت میلوپراکسیداز در بافت رکتوم.

\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه سالم در سطح ( $P<0.001$ ) است. # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا در سطح ( $P<0.001$ ) است.



الف



ب

نمودار ۴- مقایسه سطح سایتوکاین‌های سرمی  $TNF-\alpha$  (الف) و IL-6 (ب).

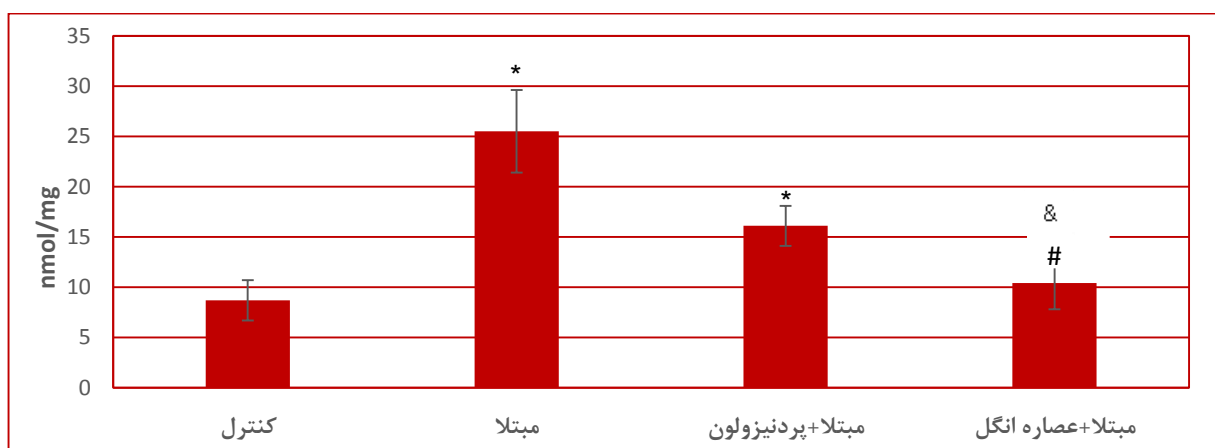
\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه سالم در سطح ( $P<0.001$ ) است. # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا در سطح ( $P<0.001$ ) است.

& نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و تحت درمان با پردنیزولون در سطح ( $p<0.05$ ) است.

اولسراتیو است (۲۲). نوتروفیل‌های فعال شده در بافت مخاطی روده گونه‌های فعال اکسیژن شامل یون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسید و پراکسید هیدروژن تولید و ترشح می‌کنند. این عوامل موجب پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش نفوذپذیری مخاط و رگ‌های خونی، افزایش ورود نوتروفیل‌ها به بافت مخاطی و توسعه التهاب می‌گردند (۱۹، ۲۳). گونه‌های فعال اکسیژن با اثر بر بیان ژن‌های سایتوکاین‌ها و آنزیم‌های درگیر در پاسخ التهابی موجب تخریب دیواره روده، ایجاد زخم، خونریزی و اسهال می‌گردند (۲۴). در شرایط آسیب و آزار بافتی سلول‌های ایمنی ذاتی سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند. این واسطه‌ها نقش مهمی را در حذف عوامل بیماری‌زا بازی می‌کنند (۲۵). با این حال زمانی که میزان تولید

IL-6 و TNF- $\alpha$  در گروه‌های درمانی فاسیولا هیپاتیکا و پریدنیزولون نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری یافته بود. البته میزان کاهش در گروه درمان شده با پریدنیزولون از نظر آماری بیشتر بود (نمودار ۴).

نتایج مربوط سنجش سطح پراکسیداسیون لیپیدی حاکی از افزایش آن در نتیجه ابتلا به بیماری بود (نمودار ۵). هر دو شیوه درمانی، منجر به کاهش سطح آن در گروه‌های درمانی نسبت به گروه رت‌های بیمار شد (نمودار ۵). البته میزان کاهش در گروه درمان شده با انگل نسبت به گروه تحت درمان با دارو از نظر آماری بیشتر بود (نمودار ۵). به طوری که در نهایت سطح پراکسیداسیون لیپیدی بین دو گروه سالم و مبتلا و درمان شده با انگل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۵).



نمودار ۵- مقایسه سطح پراکسیداسیون لیپیدی.

\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه سالم در سطح ( $P < 0.001$ ) است. # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه میتلا در سطح ( $P < 0.001$ ) است. & نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه میتلا و تحت درمان با پرنیزولون در سطح ( $P < 0.001$ ) است.

این رادیکال‌ها بیش از حد باشد و یا تولید آن‌ها در شرایط نامناسب صورت گیرد، این رادیکال‌های آزاد منجر به ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی خواهند شد. آنزیم میلوپروکسیداز (MPO) یکی از آنزیم‌های پروکسیداز است که در انسان توسط ژن MPO در کروموزوم شماره ۱ کد می‌شود و نقش مهمی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. MPO در مقادیر بسیاری در نوتروفیل‌ها ذخیره شده و با تولید هیپوهالوس اسید فعالیت ضد میکروبی خود را نشان می‌دهد. در واقع MPO یک پروتئین لیزوزومیک است که در گرانول‌های آزورفیلیک یا اولیه ذخیره شده و در صورت تحریک نوتروفیل به علت برخورد با آنتی‌ژن یا التهاب از گرانول‌ها تخلیه می‌شود (۲۶، ۲۷)؛ بنابراین

## بحث

مطالعات گذشته نشان داده است که آنزیم سیستمین پروتئاز موجود در گونه فاسیولا هیپاتیکا مانع فعالیت رسپتورهای Toll Like می‌شود. فعال شدن این دسته از رسپتورها توسط باکتری‌های روده‌ای عامل اصلی در ایجاد بیماری‌های التهابی روده مانند کولیت اولسراتیو می‌باشند (۲۱). در مدل کولیت اولسراتیو القایی توسط اسید استیک، تخریب حاصل از شرایط اسیدی ایجاد شده توسط اسید استیک منجر به شکست سدهای مخاطی شده و به این ترتیب فلور باکتریایی روده به آسانی به لایه‌های زیرین دسترسی یافته و منجر به التهاب می‌شود. در ادامه ترشح نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به بافت مخاط مشخصات مهم کولیت



مبتلا به فرم حاد کولیت اولسراتیو نه تنها مدفوع فاقد قوام دارند بلکه مقادیر زیادی خون نیز در مدفوع آن‌ها مشاهده می‌گردد. از آنجایی که به دنبال ایجاد التهاب و تخریب اپیتلیوم کولون، جذب و دفع دچار مشکل می‌گردد، لذا جذب آب به درستی صورت نمی‌گیرد و مدفوع آبکی می‌شود (۱۴). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده است که رت‌های گروه کنترل از نظر قوام شل‌ترین مدفوع را میان سایر گروه‌ها داشته‌اند. همچنین در چندین مورد مدفوع آغشته به خون مشاهده شده است. در دو گروه درمانی اگرچه خون در مدفوع ملاحظه نگردیده است ولی قوام مدفوع آن چنان سفت و طبیعی نبوده است که می‌توان آن را به عدم ترمیم کامل مخاط کولون نسبت داد. مطالعات ماکروسکوپی انجام گرفته خود یکی از مهم‌ترین نتایج حاصل از این مطالعه بوده است.

بر اساس برخی از نظریات موسوم به نظریه بهداشتی، یکی از دلایل افزایش بیماری‌های خودالتهابی و خودایمنی در شرایط کنونی، افزایش بهداشت عمومی و کاهش میزان ابتلا به عفونت‌های انگلی است (۳۱). بر همین اساس تحقیقات گذشته هم به خوبی نشان داده‌اند که استفاده از روش‌هایی همانند آلودگی عمدی مبتلایان به انگل‌های کرمی از قبیل *Strongyloides stercoralis* و یا *Trichuris suis* در کاهش شدت علائم بیماری التهابی روده در انسان موفق بوده است (۳۲). البته آلودگی عمدی با برخی از انگل‌های کرمی دیگر گاهاً منجر به نتایج متناقض شده است. به طور مثال استفاده از لارو *americanus Necator* در ۷ مورد از ۹ نفر از مبتلایان تحت آزمایش بابت بیماری التهابی روده منجر به بهبودی شده است، ولی در دو مورد دیگر وضعیت را بدتر کرده است (۳۳). طبیعی است که عفونت عمدی با کرم‌های انگلی علاوه بر خطرات فراوان، مشکل پذیرش توسط خود بیمار را هم خواهد داشت (۳۲). در عوض روش بکار رفته در تحقیق اخیر ما، استفاده از عصاره انگلی بوده است. خوشبختانه نتایج حاکی از اثربخشی در مدل حیوانی بیماری کولیت اولسراتیو است. در حال این مطالعه یک مطالعه اولیه بوده و لازم است که در آینده تحقیقات بیشتری صورت پذیرد.

### نتیجه‌گیری

در کل با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که استفاده از پردنیزولون و آنتی‌ژن سوماتیک فاسیولا هیپاتیکا به یک اندازه

این آنزیم به‌عنوان یکی از شاخص‌های التهاب حاد در نظر گرفته می‌شود زیرا به دنبال وقوع التهاب در بافت، نوتروفیل‌ها اولین سلول‌های ایمنی هستند که به ناحیه ملتهب وارد می‌شوند؛ بنابراین وجود مقادیر فراوانی از MPO در بافت بیانگر ملتهب بودن آن بافت است. از آنجا که MPO به دنبال التهاب به ماتریکس محیطی تخلیه می‌گردد، بهترین روش برای بررسی فعالیت آن در بافت ملتهب آن است که کل بافت ملتهب بررسی گردد (۲۸). بر همین اساس سنجش فعالیت آنزیم MPO بافتی در دو گروه درمانی با پردنیزولون و آنتی‌ژن انگلی کمتر از گروه کنترل مثبت بوده است.

در این مطالعه از سنجش لیپید پراکسیداسیون به‌عنوان مقیاسی جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، استفاده شد. مالون دی‌آلدئید از پراکسیداسیون لیپیدها تولید می‌شود و میزان تولید آن با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است. از این رو اندازه‌گیری MDA اندیکاتور و شاخص مناسبی برای لیپید پراکسیداسیون است (۲۹). نتایج به دست آمدن در این مورد حاکی از قوی‌تر بودن نسبت به دارو بود. اغلب مواد مشتق شده از ترکیبات طبیعی (گیاهان یا جانوران) که قابلیت تنفس هوازی دارند، سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشد؛ بنابراین نتایج حاصله دور از ذهن نیست.

بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که سطوح  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  در بیماری کولیت اولسراتیو افزایش می‌یابد. هر دو سایتوکاین از جمله مهم‌ترین سایتوکاین‌های التهابی بوده که نقش عمده‌ای در فراخوانی و فعال‌سازی لکوسیت‌ها از قبیل نوتروفیل‌ها بازی می‌کنند (۳۰). بر اساس داده‌های ما بالعکس نتایج مربوط به سطح MDA، سطوح این دو سایتوکاین در گروه درمان شده با پردنیزولون کاهش بیشتری نسبت به سایر گروه‌های درمانی نشان داد. با توجه به ماهیت ثابت‌شده ضدالتهابی پردنیزولون این امر دور از ذهن نیست.

در کنار یافته‌های فوق، داده‌های بالینی از نظر میزان بقاء و شاخص شدت بیماری نیز نشان‌دهنده مؤثر بودن هر دو رهیافت درمانی ما به صورت پایا و برابر بود. وضعیت مدفوع یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای بررسی شدت و میزان پیشرفت بیماری‌های التهابی روده در بیماران مبتلا به آن است. مدفوع نه تنها از نظر قوام بلکه از نظر وجود خون، بقایای سلول‌های اپیتلیال، میزان موکوس و غیره اطلاعات مهمی را در اختیار ما قرار می‌دهد. مطالعات کلینیکال انجام گرفته نشان می‌دهد که رت‌های

شماره ثبت ۱۵۶۰ و کد اخلاق به شماره "۵۳/پد/۳-د" بوده و تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفته است لذا نویسندگان مراتب قدردانی خود را از تمامی افرادی که در پیشبرد این مطالعه ما را یاری کردند اعلام می‌دارند.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

در کاهش علائم کولیت اولسراتیو در مدل تجربی ما مؤثر بوده است. از آنجایی که جداسازی آنتی‌ژن سوماتیک فاسیولا هپاتیکا ساده و سریع بوده لذا می‌توان از آن به‌عنوان روشی درمانی برای درمان کولیت اولسراتیو استفاده کرد؛ بنابراین یافته‌های این تحقیق ممکن است که افق جدیدی را در امر درمان بیماری‌های التهابی گشوده باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجو فرشید مشرف زاده به

### References

1. Acici M, Bolukbas CS. Seroprevalence of Fasciolosis in Equines of the Black Sea Region, Turkey. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012; 33(1):62-66
2. McCann CM, Baylis M. Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. *Veterinary Record*. 2010; 15; 166(20):612-7.
3. Sarkari B, Ghobakhloo N. Seroprevalence of human fasciolosis in a new-emerging focus of fasciolosis in yasuj district, southwest of iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2012; 7(2):15-20.
4. Boray J. Liver fluke disease in sheep and cattle. *Prime facts*. 2007; 3:1-10.
5. Getachew M, Innocent GT. Epidemiological features of fasciolosis in working donkeys in Ethiopia. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2010; 169(3-4):335-9.
6. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012; 8: 336(6086):1268-73.
7. Jenkins SJ, Allen JE. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 14: 26-32.
8. Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huang WY, Chauvin A. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*. 2005; 111: 154-159.
9. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KH. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *Journal of Immunology*. 2009; 183 (3): 1577-1586.
10. Clery DG, Torgerson P, Mulcahy G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*. 1996; 62: 71-82.
11. O'Neill SM, Mills KH, Dalton JP. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine protease suppresses Bordetella pertussis specific interferon gamma production in vivo. *Parasite Immunology*. 2001; 23 (10): 541-547.
12. Nyhlin N, Waskom A, Montgomery SM. Long-term prognosis of clinical symptoms and health-related quality of life in microscopic colitis: a case-control study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2014; 39: 963 - 72.
13. Abboud R, Pardi DS, Tremaine WJ. Symptomatic overlap between microscopic colitis and irritable bowel syndrome: a prospective study. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013; 19: 550 - 3.
14. Gisbert J.P, Chaparro M. Use of a third anti-TNF after failure of two previous anti-TNFs in patients with inflammatory bowel disease: Is it worth it? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2015; 30:1-8.
15. Macaigine G, Lahmek P, Locher C et al. Microscopic colitis or functional bowel disease with diarrhea: a French prospective multicenter study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2014; 109: 1461 - 70.
16. Kane JS, Rotimi O, Everett SM et al. Development and validation of a scoring system to identify patients with microscopic colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2015; 13: 1125 - 31.
17. Kamada N, Seo SU, Chen GY, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13:321-335.
18. Feng T, Wang L, Schoeb TR, et al. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207:1321-1332.
19. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host & Microbe*. 2014; 15:382-392.



20. Gorgulu S, Yagci G, Kaymakcioglu N, Ozkara M, Kurt B, Ozcan A, et al. Hyperbaric oxygen enhances the efficiency of 5-aminosalicylic acid in acetic acid-induced colitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2006; 51(3): 480-7.
21. Dowling DJ, Hamilton CM, Donnelly S, La Course J, Brophy PM, Dalton J, et al. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infection and Immunity*. 2010; 78(2):793-801.
22. Sheibani S, Gerson LB. Chemical colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008; 42(2):115-21.
23. Chung H, Pamp SJ, Hill JA. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell Press*. 2012; 149:1578-1593.
24. Gheibi Sh, Hashemi SR, Karimipour M, Mansouri Motlagh B, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H. Synergistic effects of hydro extract of jujube fruit in combination with Mesalazine (orally) and Asacol (intra-colonic) administration in ameliorating animal model of ulcerative colitis. *Journal of coloproctology*. 2018; 38(4):275-282.
25. Gentile NM, Khanna S. The epidemiology of microscopic colitis in Olmsted County from 2002 to 2010: a population-based study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014; 12: 838 - 42.
26. Macaigne G, Lahmek P, Locher C. Microscopic colitis or functional bowel disease with diarrhea: a French prospective multicenter study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2014; 109: 1461-70.
27. Larsson JK, Sonestedt E, Ohlsson B. The association between the intake of specific dietary components and lifestyle factors and microscopic colitis. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2016; 70: 1309 - 17.
28. Fischer H, Holst E, Karlsson F. Altered microbiota in microscopic colitis. *Gut*. 2015; 64: 1185-6.
29. Sonnenberg A, Genta RM. Inverse association between helicobacter pylori gastritis and microscopic colitis. *Inflammatory bowel disease*. 2016; 22: 182 - 6.
30. Sikander A, Sinha SK, Prasad KK et al. Association of serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) with microscopic colitis and ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60: 887 - 94.
31. Katsanos KH, Papadakis KA. Inflammatory Bowel Disease: Updates on Molecular Targets for Biologics. *Gut and Liver*. 2017; 11(4):455-463.
32. Briggs, Weatherhead J, Sastry KJ, Hotez PJ. The Hygiene Hypothesis and Its Inconvenient Truths about Helminth Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 15; 274-311.
33. Sipahi AM, Baptista DM. Helminths as an alternative therapy for intestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2017; 23(33):6009-6015.
34. Croese J, O'neil J, Masson J, Cooke S, Melrose W, Pritchard D, Speare R. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut*. 2006; 55:136-137.



## Original Article

## The Effects of *Fasciola Hepatica* on Acetic acid Induced Ulcerative Colitis in Rat Model

Esmailnejad B<sup>1\*</sup>, Abtahi Froushani SM<sup>2</sup>, Tehrani AA<sup>1</sup>, Esmaili Gouvarchin Ghaleh H<sup>3</sup>, Moshrefzadeh F<sup>1</sup>

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3. Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 07 Feb 2018

Accepted: 06 Aug 2018

### Abstract

**Background & Objective:** Ulcerative colitis is one of the common causes of gastrointestinal tract diseases in developing countries. This disease causes disability, especially in young adults, and imposes many social and economic burdens on the community. The aim of this study was to investigate the effects of *Fasciola hepatica* extract on acetic acid induced ulcerative colitis in rat model.

**Materials & Methods:** Thirty adult male Wistar rats were divided into 3 equal groups. Colitis was induced by the administration of 4% acetic acid. Control group just was administrated phosphate-buffered saline (S.C.) and the other groups were received Prednisolone (0.5 mg/kg) and *Fasciola hepatica* extract (100 mg/kg) for 10 consecutive days. Since then, the animals were euthanized and intestinal tissue and blood samples were taken. Macroscopic and microscopic features, inflammatory mediators as well as cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6 were assessed.

**Results:** The amount of the myeloperoxidase production was the same between the two treatment groups. As compared to the control, both of the treatment groups produced lower amount of TNF- $\alpha$  and IL-6, however this reduction was more pronounced in Prednisolone-induced animals than those of extract-induced. There were no significant differences between Prednisolone and *Fasciola* extract regarding gross damages and histopathological features.

**Conclusion:** since the preparation of *Fasciola* extract is easy and simple, it may be used as ameliorative agent for ulcerative colitis.

**Keywords:** Ulcerative colitis, Acetic acid, Rat, *Fasciola hepatica*, inflammation

\*Corresponding Author: : Esmailnejad Bizhan, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: b.esmailnejad@urmia.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-1781-5890>